

54 PEPTIDE RELATING TO PTHrP. PREPARATION AND USE THEREOF  
 (1) 2-207099 A (43) 16.8.1990 (19) JP  
 (21) Appl. No. 64-18623 (22) 8.2.1989  
 (71) YONEN CORP. (72) KENICHI URAGAMI  
 (51) Int. Cl. C07K7 10,A61K37 24,C07K15 12,C12N5 10,C12N15 12,  
 C12P21 00,C12P21 00,C12R1 19,C07K99 00

**NEW MATERIAL:** A polypeptide represented by formula, etc., not having any human parathyroid hormone-relating protein(PTHrP) activity and having an antagonistic activity against the physiological action of the human PTHrP or a peptide having the human PTHrP activity.

**USE:** A calcium-metabolism remedy or a hypercalcemia remedy.

**PREPARATION:** For example, a PTHrP gene is divided with a restriction enzyme into PTHrP(A) and PTHrP(B), which are synthesized into DNA fragments by a phosphoamidite method, respectively, and subsequently converted into genes corresponding to partial peptides by a ligation reaction. The genes are inserted into cloning vectors, and Escherichia coli transformed with the vectors is cultured. Plasmids are extracted from the strain to give pCU-PTHrP(A) and (B), which are treated with a restriction enzyme and combined with expression vectors. Escherichia coli is transformed with the treated expression vectors and the transformed strain is cultured, followed by providing a polypeptide from the cultured product.

1: genes 2: ligation 3: transformation

#### 54) PREPARATION OF CHEMICALLY MODIFIED LACTOFERRIN WITH HIGH AFFINITY TO CELLS

(1) 2-207100 (A) (43) 16.8.1990 (19) JP  
 (21) Appl. No. 64-29367 (22) 8.2.1989  
 (71) SNOW BRAND MILK PROD CO LTD (72) NORIHIRO KAWASAKI (5)  
 (51) Int. Cl. C07K15 22,C07K3 04,C07K3 08 A61K37 14

**PURPOSE:** To profitably provide the subject compound having a high affinity to cells, a high activity per unit to enable to reduce the required amount thereof and useful as a remedy for various diseases by modifying the amino group of a lactoferrin molecule with a guanidyl group, etc.

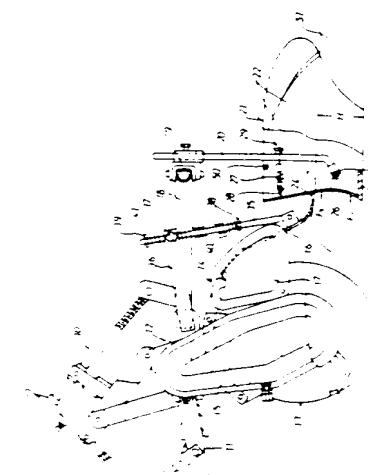
**CONSTITUTION:** A defatted human milk is pressed through a human lactoferrin-resistant monoclonal antibody affinity column and the adsorbed human lactoferrin is separated with a 0.25M sodium acetate buffer solution containing 0.15M of sodium chloride and having a pH of 3.7. The separated human lactoferrin is slowly mixed with a buffer solution containing O-methylisourea-NaOH-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and having a pH of 10 at 0.4°C to chemically modify the amino group of the lactoferrin molecule with a guanidine, thereby providing the objective chemically modified lactoferrin having a high cellular affinity.

#### 54) HEIGHT CONTROLLER FOR LISTER

(1) 2-207701 (A) (43) 17.8.1990 (19) JP  
 (21) Appl. No. 64-30682 (22) 8.2.1989  
 (71) KUBOTA LTD (72) TAKUYA MATSUDA  
 (51) Int. Cl. A01B13 02

**PURPOSE:** To avoid excessive resistance by providing the lister with a spring for energizing the lister in the forward-up direction and a means for controlling the pressure of the spring so that the force acting on the lister in the fore-upward direction is balanced to the one in the fore-upward direction during the ridge-building operation.

**CONSTITUTION:** A lister 21 is set to the bottom end of the support 20 rotatably around the horizontal shaft 25. A spring 27 for energizing the lister 21 in the fore-upward direction is set between the support 20 and the ridge builder 21 so that the force acting on the lister 21 in the fore-downward direction is balanced with the fore-upward force of the spring during the ridge-building operation. The pressure of the spring is controlled with the pressure-controlling unit 28. Consequently, the lister 21 is not exposed to excessive resistance and the distance to the prescribed ridge height can be shortened.





(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number **02207099 A**

(43) Date of publication of application **16 . 08 . 90**

(51) Int Cl

**C07K 7/10**

**A61K 37/24**

**A61K 37/24**

**C07K 15/12**

**C12N 5/10**

**C12N 15/12**

**C12P 21/00**

**//(C12P 21/00 , C12R 1:19 )**

**C07K 99:00**

(21) Application number: **01028023**

(71) Applicant: **TONEN CORP**

(22) Date of filing: **07 . 02 . 89**

(72) Inventor: **URAGAMI KENICHI  
MIKI KEIZABURO**

(54) PEPTIDE RELATING TO PTHRP, PREPARATION  
AND USE THEREOF

cultured product.

COPYRIGHT: (C)1990,JPO&Japio

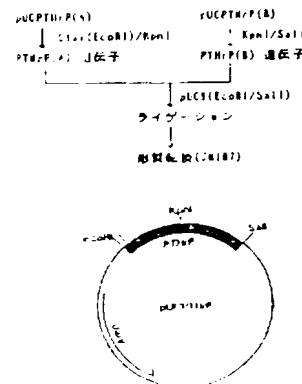
(57) Abstract:

NEW MATERIAL: A polypeptide represented by formula, etc., not having any human parathyroid hormone-releasing protein(PTHrP) activity and having an antagonistic activity against the physiological action of the human PTHrP or a peptide having the human PTHrP activity.

USE: A calcium metabolism remedy or a hypercalciuria remedy.

PREPARATION: For example, a PTHrP gene is divided with a restriction enzyme into PTHrP(A) and PTHrP(B), which are synthesized into DNA fragments by a phosphoamidite method, respectively, and subsequently converted into genes corresponding to partial peptides by a ligation reaction. The genes are inserted into cloning vectors, and Escherichia coli transformed with the vectors is cultured. Plasmids are extracted from the strain to give pCU-PTHrP(A) and (B), which are treated with a restriction enzyme and combined with expression vectors. Escherichia coli is transformed with the treated expression vectors and the transformed strain is cultured, followed by providing a polypeptide from the

Leu Leu His Asp Lys Gly Tyr Ser Ile Gln Asn  
Leu Arg Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile  
Ala Gln Ile His Thr Ala





## ⑫ 公開特許公報 (A)

平2-207099

⑬ Int. Cl.<sup>5</sup>  
 C 07 K 7/10  
 A 61 K 37/24  
 C 07 K 15/12  
 C 12 N 5/10  
 15/12  
 C 12 P 21/00

識別記号 ZNA 8318-4H  
 ADD  
 AEG 8615-4C  
 8318-4H  
 C 8214-4B  
 8717-4B C 12 N 15/00  
 8515-4B 5/00

⑭ 公開 平成2年(1990)8月16日

A  
B※

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全11頁)

⑮ 発明の名称 PTHrP関連ペプチド、その製造法及び用途

⑯ 特 願 平1-28023

⑰ 出 願 平1(1989)2月7日

⑱ 発明者 浦上 研一 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東亜燃料工業株式会社総合研究所内

⑲ 発明者 三木 敬三郎 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東亜燃料工業株式会社総合研究所内

⑳ 出願人 東亜燃料工業株式会社 東京都千代田区一ツ橋1丁目1番1号

㉑ 代理人 弁理士 谷川 英次郎

最終頁に続く

日月 未田

1. 発明の名称

PTHrP 関連ペプチド、その製造法及び用途

2. 特許請求の範囲

(1) ヒト PTHrP 活性を有さず、ヒト PTHrP 又はヒト PTHrP 活性を有するポリペプチドの生理学的作用に拮抗する活性を有するポリペプチド。

(2) 前記ポリペプチドは、以下のアミノ酸配列を含む請求項1記載のポリペプチド。

Leu Leu His Asp Lys Lys Gly Ser Ile Glu Asp  
 Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile  
 Ala Glu Ile His Thr Ala

(3) 上記アミノ酸配列のN末端側にヒト PTHrP のN末端部分配列である Ala Val Ser Glu His Glu を含まない請求項2記載のポリペプチド。

(4) 請求項2記載のアミノ酸配列から成る請求項2記載のポリペプチド。

(5) 請求項1ないし4のいずれか1項に記載のポリペプチドを有効成分とする、ヒト PTHrP に対するカルシウム代謝治療薬。

(6) 請求項1記載のポリペプチドをコードする領域を含み、大腸菌中で該ポリペプチドを発現することができる発現ベクターで大腸菌を形質転換し、該形質転換された大腸菌を培養し、その培養物から上記ポリペプチドを回収することを含む、請求項1記載のポリペプチドの製造法。

3. 発明の詳細な説明

【産業上の利用分野】

この発明は、新規な PTHrP 関連ペプチド、その製造法及びそのカルシウム代謝治療薬としての用途に関する。この発明のアンタゴニストは、高カルシウム血症の治療に用いられる。

【従来の技術】

血液中のカルシウム代謝調節因子として代表的なものには副甲状腺ホルモン (Parathyroid Hormone, PTH)、カルシトニン、ビタミンD等があるが、速が引き起こす高カルシウム血症の原因物質としては、上記のいずれでもないことが指摘されていた。

1987年になりMoseleyらにより高カルシウム

血症を呈したヒト副甲状腺上皮癌より、PTHと同じ活性を示すタンパク質が単離され、これは副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (Parathyroid Hormone related Protein, PTHrP) と命名された。また、癌患者における高カルシウム血症の原因物質がこのPTHrP であることも判明した。

さらに、Sevaらにより、PTHrP のアミノ酸配列及びcDNA塩基配列が決定されるに至り、PTHrP は141アミノ酸より成るものであることがわかった。Sevaらは、得られたcDNAより哺乳類の細胞系でPTHrP を発現させ、PTH活性換算4.8 μg/l の発現を確認している。

Rodan らは既にヒトPTHrP の1-34番目のペプチドフラグメントを化学的に合成し、ラット骨肉腫由来の細胞株ROS17/2.8においてアデニレートシクラーゼの活性の増加に関してヒトPTH(1-34) と同様の活性を持つことを確認している。

癌患者における高カルシウム血症は、癌患者全体の約10%に発症するとされ、血中のカルシ

トPTHrP 活性を拮抗する活性を有する新規なポリペプチドを得ることに成功し、この発明を完成した。

すなわち、この発明は、ヒトPTHrP 活性を有さず、ヒトPTHrP 又はヒトPTHrP 活性を有するポリペプチドの生理学的作用に拮抗する活性を有するポリペプチドを提供する。

また、この発明は、上記ポリペプチドを有効成分とする、ヒトPTHrP に対するカルシウム代謝調節薬を提供する。

さらにまた、この発明は、上記本発明のポリペプチドをコードする領域を含み、大腸菌中で該ポリペプチドを発現することができる発現ベクターで大腸菌を形質転換し、該形質転換された大腸菌を培養し、その培養物から上記ポリペプチドを回収することを含む、本発明のポリペプチドの製造法を提供する。

#### 【発明の効果】

本発明により、癌患者における、ヒトPTHrP により引き起こされる高カルシウム血症を抑える

カルシウム濃度の上昇により疼痛等様々な障害を引き起こすものである。

現在、この高カルシウム血症の治療薬として、カルシトニン関連ペプチドがあるが、その効果は一過性のものであり有効率も低い。これは、カルシトニンは破骨細胞のレセプターに結合し、骨吸収の抑制作用を示すが、高カルシウム血症の原因物質であるPTHrP の活性を抑えるわけではないためであり、従って、その効果にも限界がある。

#### 【発明が解決しようとする問題点】

従って、この発明の目的は、PTHrP に対するアンタゴニストとして作用し、PTHrP により引き起こされる高カルシウム血症を治療することができる新規なPTHrP 関連ペプチド及びその製法を提供することである。

#### 【問題点を解決するための手段】

本願発明者らは、観察研究の結果、ヒトPTHrP 活性を有さないが、ヒトPTHrP が結合する骨細胞上のレセプターに結合し、それによってヒ

トPTHrP 活性を拮抗する活性を有する新規なポリペプチドが提供された。このポリペプチドは、従来の抗PTHアンタゴニストである[Tyr<sup>34</sup>]b-PTH(7-34)に比較して有意に強くヒトPTH活性を阻害する。

また、本発明の製造法によると、従来のSevaらによる哺乳動物細胞を用いた系に比較して500倍以上の大量のポリペプチドを発現させることができる。

#### 【発明の具体的説明】

上述のように、本発明のポリペプチドは、ヒトPTHrP 活性を有さず、ヒトPTHrP 又はヒトPTHrP 活性を有するポリペプチドの生理学的作用に拮抗するものである。本願発明者らは、観察研究の結果、ヒトPTHrP は、そのN末端側から数えて第1番目ないし第6番目（以下、特に断りがない限りアミノ酸の位置はN末端から数えて示す）のアミノ酸配列であるAla Val Ser Glu His Gln が欠落すると、そのPTHrP 活性を喪失すること、及び第7番目ないし第34番目のアミノ酸配列であるLeu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln

Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu  
Ile Ala Glu Ile His Thr Ala が存在すればヒト  
PTHrP が結合する骨細胞上のレセプターに結合し  
てヒト PTHrP の生理学的活性を阻害することができることを見出した。

従って、本発明の好ましい態様においては、本発明のポリペプチドは、ヒト PTHrP の第 1 番目ないし第 6 番目のアミノ酸配列を含まず、第 7 番目ないし第 34 番目のアミノ酸配列を含むものである。このポリペプチドは、さらなるアミノ酸配列を含んでいてもよく、例えばヒト PTHrP の第 35 番目以降のアミノ酸配列を含んでいてもよい。さらに、後述の実施例で示すように、宿主となる大腸菌中の発現を促進するため、N 末端に種々の大腸菌由来のタンパク質又はポリペプチドを結合したものであってもよい。もっとも、ヒト PTHrP の第 7 番目ないし第 34 番目のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、抗 PTHrP アンタゴニストとしての活性を有するので、このアミノ酸配列のみから成っていてもよい。

リペプチドも本発明のポリペプチドに含まれる。

本発明のカルシウム代謝治療薬は、上記本発明のポリペプチドを有効成分とするものである。本発明のカルシウム代謝治療薬のヒトに対する投与量は、通常、本発明のポリペプチドの量で  $3 \times 10^{-6}$  モルないし  $3 \times 10^{-7}$  モル程度であり、投与経路は静脈注射又は筋肉内注射が好ましい。また、アンタゴニストの具体的な製剤例として、生理食塩水又はクエン酸緩衝液中に本発明のポリペプチドを  $1 \times 10^{-6}$  M ないし  $1 \times 10^{-7}$  M 含むものを挙げることができる。

本発明のカルシウム代謝治療薬は、カルシウム代謝に異常のある種々の疾患、例えば高カルシウム血症、骨粗しょう症のような骨疾患及び慢性腎不全による高カルシウム血症の治療に用いることができる。

本発明のポリペプチドは化学合成又は遺伝子工学的手法により製造することができる。アミノ酸の数が 40 以下の場合には化学合成により製造

なお、一般に、ポリペプチドの生理活性は、そのポリペプチドを構成するアミノ酸のうち少數のアミノ酸が置換し、欠落し又は付加された場合であっても維持されることがあることは当業者によってよく認識されているところである。従って、上記ヒト PTHrP の第 7 番目ないし第 34 番目のアミノ酸配列の一部のアミノ酸が置換され、消失し又はこれに少數のアミノ酸が付加されたものであって、ヒト PTHrP 活性を有さず、抗ヒト PTHrP アンタゴニスト活性を有するポリペプチドも本発明のポリペプチドに含まれ、特に請求項 2 記載のアミノ酸配列を有するものと解釈するものとする。また、特にヒト PTHrP の第 3 番目ないし第 15 番目のアミノ酸配列を欠失したもの及び C 末端から改めて第 25 番目よりも C 末端側のアミノ酸を順次消失したポリペプチドは本発明の目的を達成するものであることが確かめられている。さらに、アミノ酸が非天然の修飾アミノ酸に置換されたものであって、ヒト PTHrP 活性を有さず、抗ヒト PTHrP アンタゴニスト活性を有するポ

する方法が便利であるが、アミノ酸数が 40 を超えると化学合成が困難になるので遺伝子工学的手法により合成することが好ましい。

ポリペプチドの化学的合成法はこの分野において周知であり、市販のペプチド合成機を用いて行なうことができる。例えばアブライドバイオシステムズ社のモデル 430 ペプチドシンセサイザーを用いて Fmoc 法により行なうことができる。

遺伝子工学的手法による本発明のポリペプチドの合成は、ポリペプチドをコードする領域を含み、大腸菌中で該ポリペプチドを発現することができる発現ベクターで大腸菌を形質転換し、該形質転換された大腸菌を培養し、その培養物から上記ポリペプチドを回収することにより行なうことができる。

上記発現ベクターにおいて、本発明のポリペプチドをコードする領域は、本発明のポリペプチドをコードするものであればいかなる塩基配列を有していてもよいが、発現がスムーズになるよう大腸菌の使用頻度の高いコドンを使い、パリンド

ローム等の配列を避けることが望ましい。ヒト PTHrP の第 7 番目ないし第 34 番目のアミノ酸をコードする塩基配列としては以下の配列が好ましい。

```
CTG CTG CAC GAC AAA GGT AAA TCT ATC CAA GAT  
CTG CGT CGC CGT TTC TTC CTG CAC CAC CTG ATC  
GCT GAA ATC CAC ACT GCA
```

上記本発明のポリペプチドコード領域の上流には大腸菌での転写効率を高めるプロモーターが存在する。プロモーターは大腸菌由来のものが好ましく、特にトリプトファンプロモーターが好ましい。プロモーターの直下流に前記本発明のポリペプチドコード領域が位置していてもよいが、後述の実施例で示すように、大腸菌 *TrpE* タンパク質のような、大腸菌由来タンパク質をコードする領域の下流に上記領域が位置していてもよい。後者の場合には、本発明のポリペプチドは融合タンパク質の形態として得られる。

この発明の発現ベクターは、通常の発現ベクターと同様、抗生素耐性のような適当な選択

上記ベクターで形質転換された大腸菌により產生された本発明のポリペプチドは、菌体を遠心分離等で集め、周知のリゾチーム処理及び／又は超音波処理等で菌体を破壊し、これをゲルろ過クロマトグラフィー等にかけることにより分離精製することができる。分離精製の具体的条件は後述の実施例に詳述する。

#### [実施例]

以下、この発明を実施例に基づいてより具体的に説明するが、この発明は下記実施例に限定されるものではない。

なお、下記実施例において、それぞれの操作は特に断りがない限り、*T. Maniatis, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual"* (1982), Cold Spring Harbor 記載の方法により行なった。

#### 実施例

##### (1) クローニングベクターの構築

図 2、3 に示す通り、PThrP 遺伝子を (A) と (B) に分割し、それぞれ約 60 塩基から成る

マークー及び大腸菌内で複製するための複製開始点を有する。さらに、上記本発明のポリペプチドコード領域の下流には転写終結コドンが存在する。これらは例えば pUC9、pBR322 その他の市販の大腸菌用ベクターのものをそのまま利用することができます。

上記発現ベクターは、上記した本発明のポリペプチドコード領域を例えばホスホアミダイト法等の公知の方法により合成し、これを大腸菌用の市販のベクター又は大腸菌内で発現する公知の発現ベクターにクローニングすることにより作製することができる。後述の実施例では、大腸菌トリプトファンプロモーターを有し、大腸菌中で *TrpE* 及び *TGF-α* を発現する pAT-TrpE-TGFα (特開昭 63-28908 号記載) に部分的 PTHrP コード領域をクローニングした。

上記発現ベクターを用いた形質転換は従来の大腸菌用ベクターによる形質転換と全く同様に行なうことができる。また、大腸菌の培養条件も従来と同様に行なうことができる。

DNA フラグメントをホスホアミダイト法により合成した。合成したフラグメントを逆相クロマトグラフィーにより精製し、図 4 に示した通り前半部 (A) についてライゲーション反応を行ない、約 200 塩基対から成る (A) の部分的ペプチドに対応する遺伝子を得た。さらに後半部 (B) についても同様な操作を行なった。

得られた遺伝子 (A)、(B) の 5' 及び 3' 末端はどちらも制限酵素 *EcoRI* 部位及び *SalI* 部位を持ち、それぞれ独立に *EcoRI* 及び *SalI* で消化したクローニングベクター pUC9 に挿入した (図 5)。これを用い大腸菌 JM107 株を形質転換し、40 μg/ml のアンビシリン、IPTG 及び X-gal 存在下、L 培地にて一液培養し、継続株を得た。

得られた継続株よりプラスミドを抽出した後サンガー法により挿入遺伝子の塩基配列を調べ、設計した通りの遺伝子配列を持つことを確認した。この目的とする PTHrP (A) 及び PTHrP (B) を含むクローニングベクターを持つ菌株をそれぞれ pUC-PThrP (A) 及び pUC-PThrP (B) と命名した。

(2) 部分ペプチド (A) 及び (B) の直接発現ベクターの構築。

以下、部分ペプチド (A) の直接発現ベクターの構築について記載する。

pUC-PTHrP(A) 遺伝子断片を抽出し、別途、制限酵素 *Cla*I, *Sall* で消化した発現ベクター pAT-X のラージフラグメントと T 4 リガーゼを用いて結合した。これを用い、大腸菌 HB101 株を形質転換し、40 μg/ml のアンビシリン存在下、L 培地にて一晩培養し、候補株を得た。得られた候補株よりプラスミドを抽出し、制限酵素により目的とする挿入遺伝子を持つ株を得、これを pAT-PTHrP(A)/HB101 株とした。

部分ペプチド (B) に付いても同様であり、得られた株を pAT-PTHrP(B)/HB101 株とした。

(3) 部分ペプチド (A) 及び (B) の融合タンパク質とした発現ベクターの構築。

以下、部分ペプチド (A) について記す。

pUC-PTHrP(A)/JM107 株より制限酵素 EcoRI, *Sall* で消化し、約 200 塩基対の PTHrP(A) 遺伝子断

限酵素による解析の結果、PTHrP 遺伝子の挿入を確認し、この株を pAT-PTHrP/HB101 株とした。

(4) PTHrP の融合タンパク質の発現ベクターの構築

pUC-PTHrP(A)/JM107 株及び pUC-PTHrP(B)/JM107 株をそれぞれ、制限酵素 EcoRI, *Kpn*I 及び *Kpn*I, *Sall* で切断し、約 200 塩基対の PTHrP 前半部分遺伝子と約 210 塩基対の後半部分遺伝子を得た。両者及び制限酵素 *Cla*I, *Sall* で消化した発現ベクター pAT-X のラージフラグメントを T 4 リガーゼを用い結合した。これを用い大腸菌 HB101 株を形質転換し、40 μg/ml のアンビシリン存在下、L 培地にて一晩培養し、候補株を得た。得られた候補株よりプラスミドを抽出し、制限酵素による解析の結果、PTHrP 遺伝子の挿入を確認し、この株を pAT-TrpE-PTHrP/HB101 株とした。

(5) 各種ベクターの発現

構築した発現ベクターを含む上記 pAT-PTHrP(A)/HB101 株、pAT-PTHrP(B)/HB101 株、pAT-

片を抽出し、別途、制限酵素 EcoRI, *Sall* で消化した発現ベクター pAT-TrpE-TGF-α のラージフラグメントと T 4 ライゲースを用いて結合した。これを用い大腸菌 HB101 株を形質転換し、40 μg/ml のアンビシリン存在下、L 培地にて一晩培養し、候補株を得た。得られた候補株よりプラスミドを抽出し、制限酵素により目的とする挿入遺伝子を持つ株を得、これを pAT-TrpE-PTHrP(B)/HB101 株とした。

(6) PTHrP の直接発現ベクターの構築

pUC-PTHrP(A)/JM107 株及び pUC-PTHrP(B)/JM107 株をそれぞれ制限酵素 *Cla*I, *Kpn*I 及び *Kpn*I, *Sall* で切断し、約 200 塩基対の PTHrP 前半部分遺伝子と、約 210 塩基対の後半部分遺伝子を得た。両者及び制限酵素 *Cla*I, *Sall* で消化した発現ベクター pAT-X のラージフラグメントを T 4 リガーゼを用い結合した(図 6)。これを用い大腸菌 HB101 株を形質転換し 40 μg/ml のアンビシリン存在下、L 培地にて一晩培養し、候補株を得た。得られた候補株よりプラスミドを抽出し、制

TrpE-PTHrP(A)/HB101 株、pAT-TrpE-PTHrP(B)/HB101 株、pAT-PTHrP(A)/HB101 株又は pAT-TrpE-PTHrP(B)/HB101 株について上記と同様の条件下で培養を行ない組換えタンパク質の発現を調べた。

以下、pAT-TrpE-PTHrP(A)/HB101 株について記載するが、他の株についてもその処理は実質的に同じである。

pAT-TrpE-PTHrP(A)/HB101 株を 40 μg/ml のアンビシリンを含む 32 ml の L 培地中で一夜培養した後、3.2 ml の 0.5% カゼミノ酸を含む M 9 培地に接種し、37°C で培養し、588 nm における吸光度が 0.5 になるまで培養したところでインドールアクリル酸を最終濃度 30 mg/l になるように加え、さらに 20 時間培養を継続した後、遠心分離により 6 g の固体を集めた。

集めた固体を 2 mg/ml のリゾチーム、2 mM EDTA 及び 100 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を含む溶波中に懸濁し、0°C、30 分間放置した。さらに β-メルカブトエタノール 35 μl を加え、

超音波処理を行ない固体を粉碎した。一塊攪拌した後遠心分離により可溶性固分である上清と不溶性固分である沈殿に分離し、それぞれ、Swank と Hunres の方法に従い、8 M 鹽素存在下 15% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なったところ可溶性及び不溶性固分にそれぞれ 9 : 1 の割合で目的とする PTHrP(A) タンパク質の発現を確認した。また、PTHrP の 1~34 アミノ酸長の合成ペプチドに対するポリクローナル抗体を用い発現を調べたところ 30 ng/2 以上の PTHrP(A) の発現量が免疫学的活性として得られた。得られた可溶性固分を凍結濃縮し、セファデックス G-75 (ファルマシア社製) ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより分離精製した。ゲルろ過の具体的条件は溶出液 : 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 、カラム : φ 2.6 x 100 cm 、流速 2.2 ml/15 分であった。溶出固分を集め、凍結乾燥を行ない、2.0 mg の PTHrP(A) タンパク質を得た。このものの純度は逆相カラムクロマトグラフィー及び SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により單一のものであることを確認した。

実験例2

アプライドバイオシステムズ社のモデル 438 ペプチドシンセサイザーを用いて F... 法によりヒト PTHrP(7-34)NH<sub>2</sub> を合成した。

合成したヒト PTHrP(7-34)NH<sub>2</sub> についての *in vitro* 及び *in vivo* の効果を試験した。

#### in vitroにおける拮抗作用

方法 :

ラット骨肉腫由来細胞株 ROS17/2.8 (受託番

佐藤、"Acta Endocrinologica", vol. 116, p. 113, (1987) を Ham's F12 培地で 2 日間培養した。F 1 2 培地 (Tris 10 mM, BSA 0.1%, IBMX 0.5 mM を含む) で洗った後、濃度を変えたヒト PTHrP(7-34)NH<sub>2</sub> フラグメント及びヒト PTHrP(1-34)NH<sub>2</sub> を加え、37°C, 10 分間インキュベートした。水上、1M HCl を加えた後、細胞を集め、上清を市販 (ヤマサ社製) の CAMP RIA のキットで濃度を定量した。

その結果、ヒト PTHrP(1-34)NH<sub>2</sub> に対するヒト PTHrP(7-34)NH<sub>2</sub> の拮抗作用は従来のヒト PTH に対するアンタゴニストである [Tyr<sup>1</sup>]bPTH(7-34) に比較し、非常に優れていることが判明した。

図 8 は、PTHrP 活性を持つ PTHrP(7-34) の ROS17/2.8 細胞に対するアデニレートシクラーゼ活性 100 とした時の各種 PTHrP 合成フラグメントの阻害効果を調べた図で、PTHrP(7-34)NH<sub>2</sub> が最も強く阻害し、アンタゴニストとして優れていることを示している。

さらに、図 9 は、PTHrP(1-34) の濃度を高く

できることを示している図で、この結果より、 PTHrP(7-34)NH<sub>2</sub> が確かにアンタゴニストとして作用していることが証明できた。

ROS17/2.8 を上記と同様に培養し、HBSS で洗浄した後、一定量の [<sup>125</sup>I]-PTHrP(1-34)NH<sub>2</sub> と濃度を変化させたラベルをしていないヒト PTHrP(7-34)NH<sub>2</sub> フラグメントを加え、2 時間室温でインキュベートした。1M NaOH で溶出し、ヤカウンターによりレセプター結合した [<sup>125</sup>I] PTHrP(1-34)NH<sub>2</sub> 濃度を測定した。その結果、ヒト PTHrP(7-34)NH<sub>2</sub> は従来のアンタゴニストである [Tyr<sup>1</sup>]bPTH(7-34)NH<sub>2</sub> に比較し、レセプター結合能が優れていることがわかった (図 10)。

#### in vivo での効果

ヒト高カルシウム血症を呈した患者より得た 2 種の腫瘍培養株 Lu61 (肺臓平上皮癌) 及び Fujoka (肺癌) を植え、高カルシウム血症を呈したタードマウスによるモデル実験系を用いて試験を行なった。

ヒトPTThrP(7-34)NH<sub>2</sub>を0.1% BSA含有クエン酸緩衝液(pH6.5)1mlに溶解し、ヌードマウスの尾静脈より10 μg/マウスに成るよう投与した。投与期間はLu61細胞については投与3時間後及び5時間後に複数投与し、Fujeoka細胞については最初のみとした。

直後及び図1-1及び図1-2にそれぞれ示す点において採血し、血清カルシウム濃度を原子吸光により測定した。

その結果、ヒトPTThrP(7-34)NH<sub>2</sub>は正常マウスには作用せず、Lu61、Fujeokaを移植し、高カルシウム血症を呈したマウスにのみ、36時間以上の長期にわたりカルシウム濃度を正常レベルまで低下した(図1-1及び図1-2)。10 μg/マウスはヒトに換算すると500 μg/ヒトになり、実際の治療薬としても問題のない量であった。

以上のように、本発明の治療薬は1回の投与に対して数十時間以上の持続効果があり、質くほど優れており、骨疾患及び中枢神経が関与する疾患の治療薬としてあるいは臨床診断薬として有用

及び肺癌細胞をヌードマウスに植えて高カルシウム血症を呈させた場合における本発明の治療薬の高カルシウム血症治療効果を示す図である。

である。

#### 4. 図面の簡単な説明

図1はこの発明の発現ベクターにおけるPTThrPコード領域付近の制限酵素地図。

図2及び図3は、それぞれPTThrP(A)及びPTThrP(B)をコードする遺伝子の塩基配列を示す図。

図4ないし図7はこの発明の発現ベクターの構造の操作を説明するための図。

図8はPTThrP活性を持つPTThrP(7-34)のROS17/2.8細胞に対するアデニレートシクラーゼ活性100とした時の各種PTThrP合成フラグメントの阻害効果を示す図。

図9は種々の濃度のPTThrP(1-34)に対して種々の濃度のPTThrP(7-34)NH<sub>2</sub>を加えた時のサイクリックAMPの量を示す図。

図10は、この発明のヒトPTThrP(7-34)及び従来のアンタゴニストのレセプターに対する特異的結合能の強さを示す図。

図1-1及び図1-2は、それぞれ肺臍平上皮癌

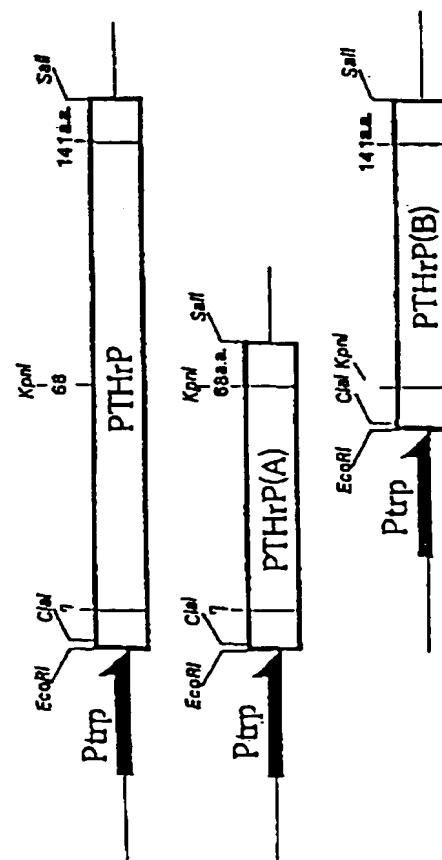


図1

## PTHrP (A)

EcoRI C<sub>1</sub>  
[M] TTC ATC GAT ATC CTC CTC GAC GAA GCT TTT CCA TTT AGA TAG GTT CTA GTC GCA GCA  
Ile Asp Met Leu Leu Ile Asp Lys Ser Ile Glu Lys Ser Ile Glu Asp Leu Arg Arg  
  
 PstII  
TTC TCC CTC CAC CAC CTC ATC GCT GAA ATC CGC CCT GCT AGC TGT GCT TCC GCT TGT GAT  
AGC AAC GAC GTC GTC GAC TAG CGA CTT TAC GTC TGA GCA CGA TGC GAA AAC CCA AGA  
Phe Phe Leu Ile Ile Leu Ile Ala Glu Ile Thr Ala Glu Ile Arg Ala Thr Ser Glu  
  
 KpnI S<sub>1</sub>  
GAC GAC GAA GGT GCG TAC GCT TAA TAA GCA  
CTG CTC CTT CCA GCG ATT GAC ATT CAG C<sub>1</sub>  
Asp Asp Glu Glu Arg Tyr Leu STP STP

図 2

PTHrP (B)  
EcoRI C<sub>1</sub>  
[M] TTC ATC GAT ATC CTC TAC CTC ACC CGC GAA ACC AGC AGA GCT GAA ACC TAG AAA GAA  
TTC GCA TAC CGC ATT GAC TGG CTC ATT GAC TGG TCC TTT GCA ATT TGG ATT GCA AAC CCA AGA  
Ile Asp Met Leu Lys Thr Pro Gly Lys Lys Lys Lys Lys Lys Pro Gly Lys Lys Val Glu Thr Lys Lys  
  
 S<sub>1</sub>  
[GAG CGC CTC AAA ACC CGC GGT AAA AMG AMG CGC GAA ACC AGC AGA GCT GAA ACC TAG AAA GAA  
GTC GCG GAC TTT TGG GCG CCA TTT TCC TTT GCA ATT GAC TGG CTC ATT GAC TGG ATT GCA AAC CCA  
Gln Pro Leu Lys Thr Pro Gly Lys Lys Lys Lys Lys Lys Pro Gly Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys  
  
 KpnI S<sub>1</sub>  
[GAG AAA AMG AMG CGT AGC GCT TCT CCT TGG CTC GAC TCT GCT ATT ACC GAA GCA TCC GCT  
GTC ATT TGG TTT GCA GCA TGG GAA AGA CGC GTC AGA CGC ATT GAC TGG CTC ATT GAC TGG ATT GCA AAC  
Glu Lys Lys Lys Arg Arg Thr Arg Ser Ala Pro Leu Asp Ser Gly Val Thr Gly Ser Gly  
  
 BstEII  
TTC GAA GGT GAC CAC CTC TCT GAC ACC TCT AGG AGA GCA GTC ATT GAC TGG CTC ATT GAC TGG ATT GCA AAC  
GAC CTT CCA CTC GTC GAC GAC AGA CGC ATT GAC TGG CTC ATT GAC TGG CTC ATT GAC TGG ATT GCA AAC  
Leu Glu Glu Asp His Leu Ser Asp Thr Ser Thr Ser Leu Glu Leu Asp Ser Arg Arg Arg Arg  
  
 S<sub>1</sub>  
CAC TAA TAA G<sub>1</sub>  
GTC ATT ATT CAS C<sub>1</sub>  
His STP STP

図 3

## ライゲーション PTHrP (A)

## 分画番号 2-7

↓ ATP  
↓ キナーゼ K. B. 37°C 1時間  
↓ 100°C 2分  
↓ 分画番号 1, 8  
アニーリング  
↓  
ライゲーション 1時間  
↓  
10% PAGE  
↓ 抽出  
↓ エタノール

合成 PTHrP (A/B) 遺伝子  
pUC9(EcoRI/SalI)  
ライゲーション  
導入試験 (JM107)

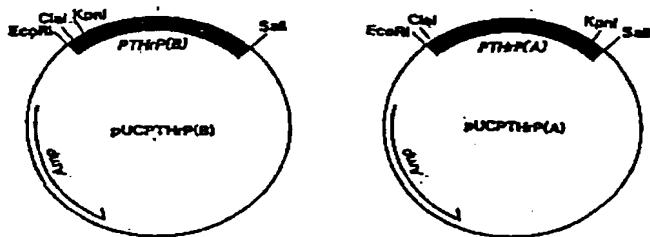


図 5

図 4

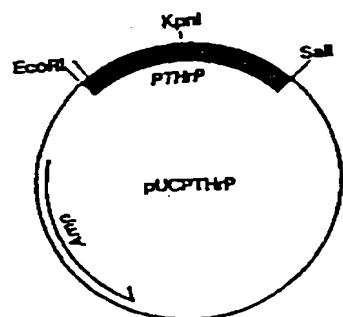
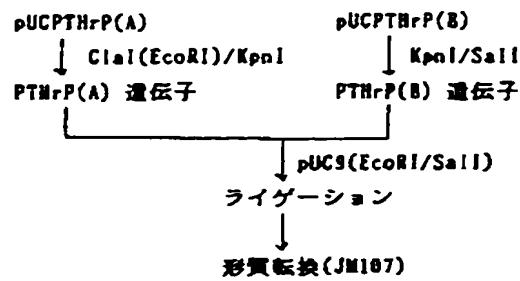


図 6

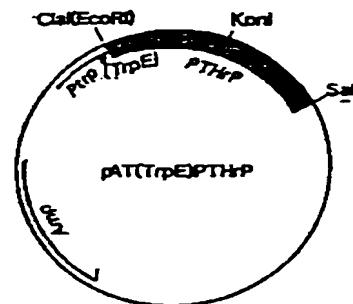
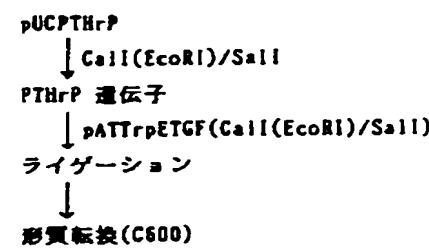


図 7

## PThrP剝離シカリ活性の図表 3

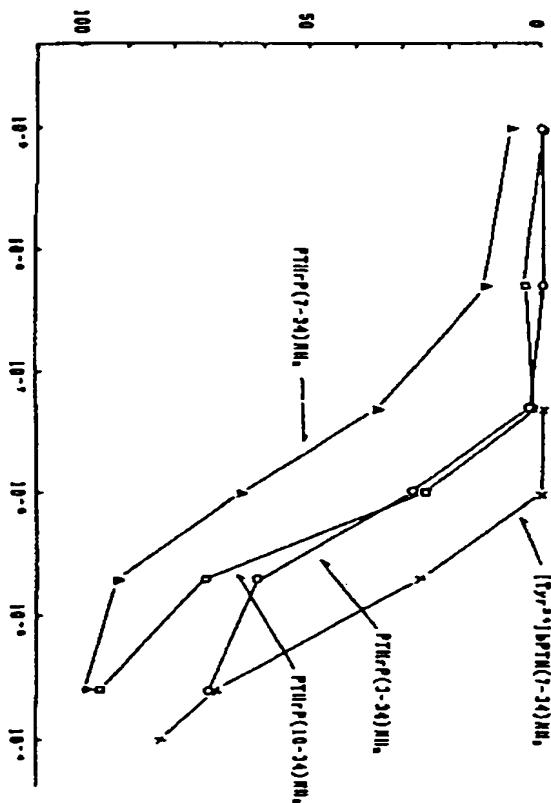


図 8

## 特異的結合 図

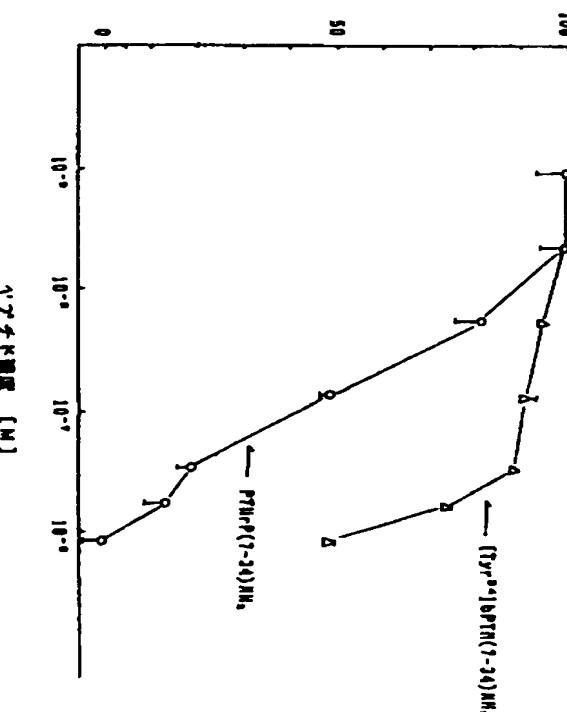
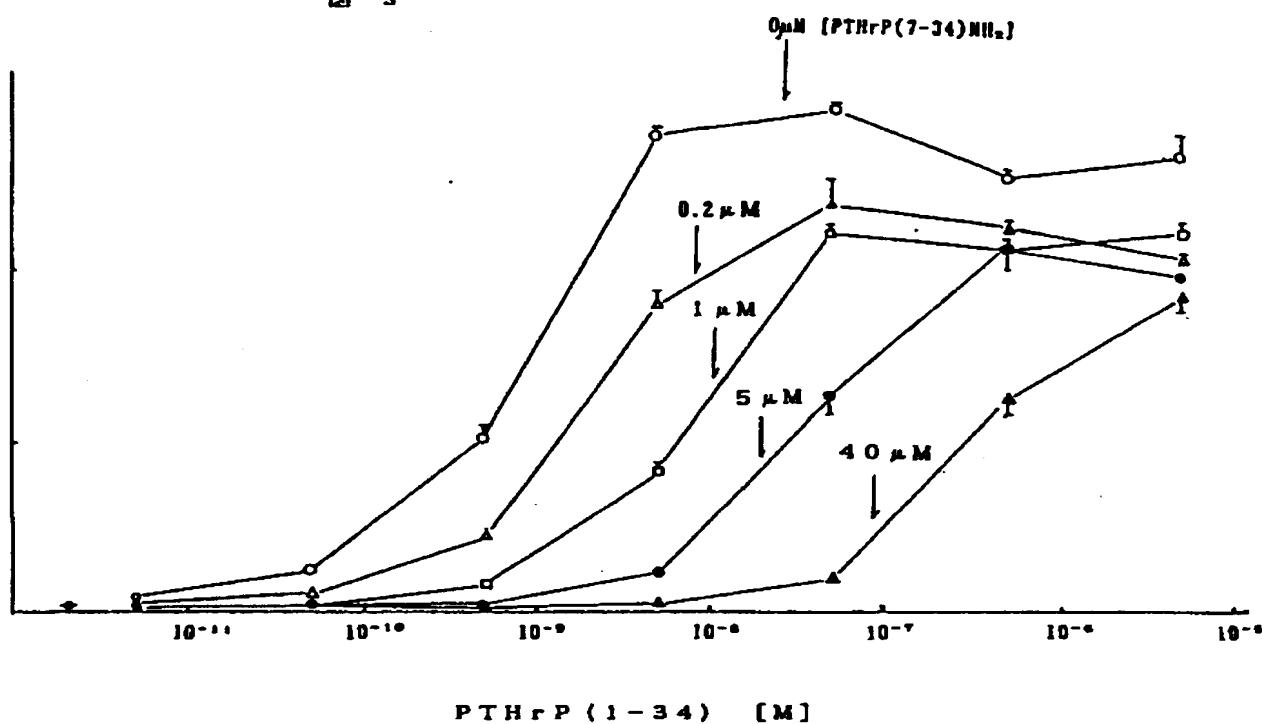


図 10

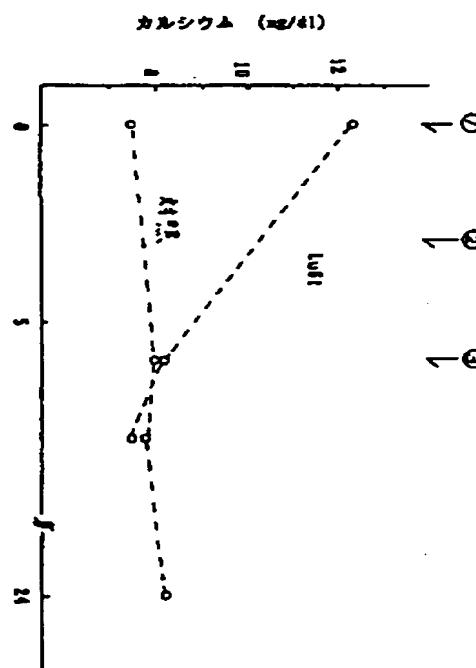
図 9

cAMP (pmo)/10<sup>6</sup> cells

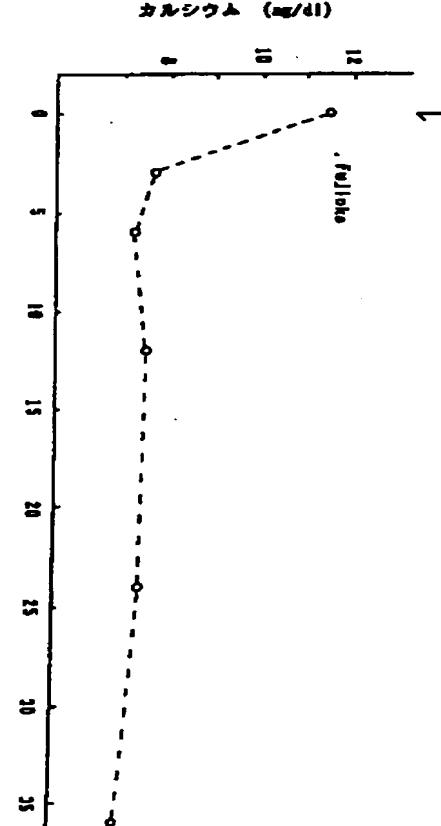
PTHrP (1-34) [M]

カルシウム (mg/dl)

時間 (min)



時間 (min)



第1頁の続き

⑤Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

//(C 12 P 21/00  
C 12 R 1:19)  
C 07 K 99:00

